

Rec'd PCT/PTO 07 JAN 2005

T/JP03/08573  
10/520901  
07.07.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 7月 8日

REC'D 22 AUG 2003

出願番号  
Application Number: 特願 2002-198941

WIPO PCT

[ST. 10/C]: [JP 2002-198941]

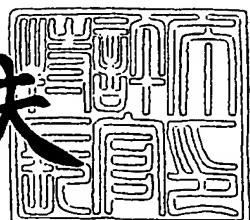
出願人  
Applicant(s): 関西ティー・エル・オー株式会社

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2003-3063280

【書類名】 特許願  
【整理番号】 42002JP  
【提出日】 平成14年 7月 8日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61P 35/00  
【発明者】  
【住所又は居所】 岡山県岡山市鹿田町二丁目 5番 1号 岡山大学大学院医  
歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科内  
【氏名】 藤原 俊義  
【発明者】  
【住所又は居所】 岡山県岡山市鹿田町二丁目 5番 1号 岡山大学大学院医  
歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科内  
【氏名】 白木屋 佳子  
【発明者】  
【住所又は居所】 岡山県岡山市鹿田町二丁目 5番 1号 岡山大学大学院医  
歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科内  
【氏名】 川嶋 健  
【発明者】  
【住所又は居所】 岡山県岡山市鹿田町二丁目 5番 1号 岡山大学大学院医  
歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科内  
【氏名】 田中 紀章  
【発明者】  
【住所又は居所】 石川県金沢市宝町 13-1 金沢大学医学部産婦人科内  
【氏名】 京 哲  
【特許出願人】  
【識別番号】 899000046  
【氏名又は名称】 関西ティー・エル・オー株式会社

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 岡山県岡山市鹿田町二丁目 5番 1号 岡山大学大学院医  
歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科内

【氏名又は名称】 藤原 俊義

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 岡山県岡山市鹿田町二丁目 5番 1号 岡山大学大学院医  
歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科内

【氏名又は名称】 白木屋 佳子

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 岡山県岡山市鹿田町二丁目 5番 1号 岡山大学大学院医  
歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科内

【氏名又は名称】 川嶋 健

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 岡山県岡山市鹿田町二丁目 5番 1号 岡山大学大学院医  
歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科内

【氏名又は名称】 田中 紀章

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 石川県金沢市宝町 13-1 金沢大学医学部産婦人科内

【氏名又は名称】 京 哲

## 【代理人】

【識別番号】 100065215

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-6203-0941

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 瞳子

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9912218

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 腫瘍細胞において選択的に増殖する腫瘍融解ウイルス

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトテロメラーゼのプロモーター及びE1遺伝子を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項2】 ヒトテロメラーゼのプロモーターがhTERTである請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】 E1遺伝子が、E1A遺伝子、IRES配列及びE1B遺伝子をこの順に含むことを特徴とする請求項1又は2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むウイルス。

【請求項5】 請求項1～3のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むアデノウイルス。

【請求項6】 請求項4又は5に記載のウイルスを有効成分とする抗癌剤。

【請求項7】 請求項4若しくは5に記載のウイルス又は請求項6に記載の抗癌剤を用いた癌の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腫瘍細胞において増殖することにより抗腫瘍作用を示すウイルス及び該ウイルスを含む抗癌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

現在、癌の治療の1つとして、遺伝子治療が行われている。しかし、遺伝子治療では、安全性のために非増殖性ウイルスベクターを用いて遺伝子導入するため、標的細胞の範囲にしか適用できず、また、導入効率が低いために満足のいく治療効果が得られていない。

【0003】

また、癌化した細胞又は不死化した細胞株においてテロメラーゼの活性が増大

している頻度が高く、生殖系列の細胞、血球系細胞、上皮系幹細胞等以外の正常な体細胞ではテロメラーゼの活性はほとんど検出されないことが知られている。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の主な目的は、腫瘍細胞において増殖し、抗癌作用を示すウイルスを提供することである。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、テロメラーゼのプロモーターを有し、且つ、増殖能を有するウイルスを癌細胞に感染させることにより、ウイルスの増殖により癌細胞を死滅させることができることを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

#### 【0006】

即ち、本発明は以下の項1～7に関する。

#### 【0007】

1. ヒトテロメラーゼのプロモーター及びE1遺伝子を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

#### 【0008】

2. ヒトテロメラーゼのプロモーターがhTERTである上記項1に記載のポリヌクレオチド。

#### 【0009】

3. E1遺伝子が、E1A遺伝子、IRES配列及びE1B遺伝子をこの順に含むことを特徴とする上記項1又は2に記載のポリヌクレオチド。

#### 【0010】

4. 上記項1～3のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むウイルス。

#### 【0011】

5. 上記項1～3のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むアデノウイルス。

#### 【0012】

6. 上記項4又は5に記載のウイルスを有効成分とする抗癌剤。

#### 【0013】

7. 上記項4若しくは5に記載のウイルス又は請求項6に記載の抗癌剤を用いた癌の治療方法。

#### 【0014】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、多くの癌細胞がテロメラーゼ活性を有することから、テロメラーゼのプロモーターを導入した遺伝子を有し、且つ、増殖能を有するウイルスを癌細胞において増殖させることにより、癌細胞を死滅させることを特徴とする。

#### 【0015】

本発明において用いられるウイルスは特に限定されないが、安全性等の点からアデノウイルスが好ましい。また、アデノウイルスの中でも、使用の簡便さ等の点からタイプ5のアデノウイルスが特に好ましい。

#### 【0016】

ウイルスのポリヌクレオチドに含まれるE1遺伝子とは、ウイルスの有するDNA複製に関する初期遺伝子 (early : E) と後期遺伝子 (late : L) のうちの初期遺伝子の一つをいい、E1遺伝子はウイルス・ゲノムの転写の制御に係わるタンパク質をコードしている。

#### 【0017】

また、E1遺伝子は、E1A、E1B等から構成されることが知られている。E1A遺伝子によりコードされるE1Aタンパク質は、感染可能なウイルス產生に必要な遺伝子群 (E1B、E2、E4等) の転写を活性化する。E1B遺伝子でコードされるE1Bタンパク質は、後期遺伝子 (L遺伝子) のmRNAが感染した宿主細胞の細胞質へ蓄積するのを助け、宿主細胞のタンパク質合成を阻害することで、ウイルスの複製を促進する。E1A遺伝子、E1B遺伝子の配列は、それぞれ以下の配列1及び2に示す。

#### 【0018】

本発明において、E1遺伝子は公知のものをそのまま用いることもできるが、E1A遺伝子、IRES配列及びE1B遺伝子をこの順に有するもの、即ち、IRES配列をE1A遺伝子とE1B遺伝子との間に挿入したものを使用することが好ましい。ウイルスが宿主細胞に感染した際に、増殖能が高くなるからである。

#### 【0019】

IRESとは、ピコルナウイルス科に特異的なタンパク質合成開始シグナルで、18SリボソームRNAの3'末端と相補的な配列があるためリボソーム結合部位としての役割を果たすと考えられている。ピコルナウイルス科のウイルス由来mRNAはこの配列を介して翻訳されることが知られている。IRES配列からの翻訳効率は高く、mRNAの途中からでもキャップ構造非依存的にタンパク質合成が行われる。したがって、本ウイルスでは、ヒトテロメラーゼのプロモーターによりE1A遺伝子とIRES配列の下流にあるE1B遺伝子の両方が独立に翻訳される。IRES配列を以下の配列3に示す。

#### 【0020】

また、本発明のウイルスの遺伝子は、ヒトテロメラーゼのプロモーターをE1遺伝子の上流に有することが好ましい。テロメラーゼ活性を有する癌細胞内で増殖を促進することができるからである。ヒトテロメラーゼのプロモーターであれば種類などは限定されないが、その中でhTERTが好ましい。

#### 【0021】

hTERTはヒトテロメラーゼ逆転写酵素をコードする遺伝子であり、その5'末端の上流1.4kbpの領域には多くの転写因子結合配列が確認されている。その領域がhTERTプロモーターと考えられるが、中でも翻訳開始部位の上流181 bpの配列が下流の遺伝子発現に重要なコア領域である。本発明において、このコア領域を含むものであれば、限定されずに使用することができるが、このコア領域を完全に含む上流378 bp程度の配列をhTERTプロモーターとして使用するのが好ましい。この378 bp程度の配列は、181 bpのコア領域単独の場合と比べて、その遺伝子発現効率が同等であることが確認されている。hTERTの配列を以下の配列4示す。

#### 【0022】

本発明のテロメラーゼのプロモーター及びE1遺伝子（E1A遺伝子、IRES遺伝子及びE1B遺伝子）を有する遺伝子は、通常の遺伝子工学的手法により得ることができる。

#### 【0023】

例えば、293細胞等のE1遺伝子を発現している細胞からE1A-S、E1A-AS、E1B-S、E1B-AS等のプライマーを用いて、RT-PCR及び／又はDNA-PCRを行うことによりE

E1A遺伝子及びE1B遺伝子を増幅することができる。必要に応じてTAクローニングのような公知の方法を用いて配列を確認した後、EcoRIのような公知の制限酵素でE1A及びE1BのDNA断片を切り出すことができる。

#### 【0024】

pIRESのような公知のベクターにE1A-IRES-E1Bを挿入し、次いで、MluI、BglII等の制限酵素で切り出したhTERTプロモーター配列を、E1Aの上流にあるXhoI等の部位に挿入することができる。

#### 【0025】

必要に応じて、pShuttleなどの公知のベクターに含まれるサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターをMfeI、NheI等の制限酵素により取り除き、その部位にp hTERT-E1A-IRES-E1Bより制限酵素NheIおよびNotIで切り出した配列を挿入することができる(得られたものを「pSh-hAIB」という。)。

#### 【0026】

pSh-hAIBからI-CeuI、P1-SceI等の制限酵素により必要な部分の配列を切り出し、Adeno-X Expression System(CLONTECH)等の市販のキットを用いてAdeno-X Viral DNA等のウイルスのDNAに挿入することができる(得られたものを「Adeno X-hAIB」という。)。

#### 【0027】

AdenoX-hAIBをPacI等の公知の制限酵素により線状化した後、293細胞等の培養細胞にトランスフェクションし、感染性のある組換えアデノウイルスを作製することができる(得られたものを「TRAD」ということがある。)。

#### 【0028】

本発明のウイルスは、抗癌剤として使用することができる。例えば、単なる癌の治療だけでなく、手術後の再発予防、転移の防止及び/又は予防等にも使用できる。

#### 【0029】

本発明の抗癌剤を適用する癌の種類としては、限定されるものではなく、あらゆる種類の癌に用いることができる。特に、例えば、胃、大腸、肺、肝、前立腺、脾、食道、膀胱、胆嚢・胆管、乳房、子宮、甲状腺、卵巣等における固形癌に

有効である。

#### 【0030】

本発明の抗癌剤は、そのまま患部に適用することもできるし、あらゆる公知の方法、例えば、静脈、筋肉、腹腔内又は皮下といった注射、鼻腔、口腔又は肺からの吸入、経口投与、坐剤、外用剤等により生体（対象となる細胞や臓器）に導入することもできる。

#### 【0031】

生体、即ち癌細胞に導入、即ち感染した本発明のウイルスは、該細胞内で増殖し、該細胞を死滅させることができる。そうすることによって、癌を治療したり、癌細胞の増殖を抑制したり、転移を防いだりすることができる。

#### 【0032】

また、例えば凍結などの方法により扱いやすくした後、そのまま若しくは賦形剤、增量剤、結合剤、滑沢剤等公知の薬学的に許容される担体、公知の添加剤（緩衝剤、等張化剤、キレート剤、着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等が含まれる。）などと混合して医薬組成物として調整することができる。

#### 【0033】

本発明の抗癌剤は、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、丸剤、液剤、シロップ剤等の経口投与剤、注射剤、外用剤、坐剤、点眼剤等の非経口投与剤などの形態に応じて、経口投与又は非経口投与することができる。好ましくは、筋肉、腹腔等への局部注射、静脈への注射等が例示される。

#### 【0034】

投与量は、有効成分の種類、投与経路、投与対象、患者の年齢、体重、性別、症状その他の条件により適宜選択されるが、一日投与量として、通常有効成分である本発明ウイルスの量を $10^6$ ～ $10^{11}$ PFU程度、好ましくは $10^9$ ～ $10^{11}$ PFU程度とするのがよく、1日1回投与することもでき、数回に分けて投与することもできる。

#### 【0035】

また、本発明のウイルスを使用する際には、公知の免疫抑制剤等を用いることにより、生体の免疫を抑制し、該ウイルスが感染し易くすることもできる。

#### 【0036】

更に、本発明のウイルスは、従来の遺伝子治療で用いられている例えばp53遺伝子を含むような非増殖性ウイルス、公知の抗癌剤及び放射線からなる群から選ばれる少なくとも1種の抗癌剤を併用することもできる。

### 【0037】

本発明の抗癌剤は、以下の理由で副作用が生じる可能性は極めて低いと考えられ、非常に安全な製剤であるということができる。

- (1) 正常の体細胞ではテロメラーゼ活性がほとんどなく、また、造血細胞等の浮遊細胞では本発明のウイルスは感染しにくい。
- (2) 本発明のウイルスは増殖能を有するので、通常の遺伝子治療で用いられている非増殖性ウイルスよりも低い濃度で使用することができる。
- (3) 本発明のウイルスが過剰に投与された場合であっても、生体内の通常の免疫作用によって抗ウイルス作用が働く。

### 【0038】

#### 【実施例】

以下、本発明を更に詳しく説明するために実施例を挙げるが、いうまでもなく本発明はこれらに限定されるものではない。

### 【0039】

#### 実施例1

##### 〈TRADの作製〉

293細胞から抽出したRNAから特異的プライマー (E1A-S：配列5、E1A-AS：配列6) を用いてRT-PCRを行い、897 bpのE1A遺伝子を増幅した。293細胞から抽出したDNAよりプライマー (E1B-S：配列7、E1B-AS：配列8) を用いてDNA-PCRを行い、1822 bpのE1B遺伝子を増幅した。

### 【0040】

それぞれのPCR産物のTA Cloning (TA Cloning Kit Dual Promoter; Invitrogen) を用いて、シーケンスを確認した後、制限酵素EcoRIにより、各々911 bp (E1A) 、1836 bp (E1B) のDNA断片を切り出した。

### 【0041】

pIRESベクター (CLONTECH) のMluI切断部位にE1Aを、SalI部位にE1Bをそれぞ

れ順方向に挿入した (E1A-IRES-E1B) 。

#### 【0042】

制限酵素MluIおよびBglIIで切り出した455 bpのhTERTプロモーター配列を、E1A-IRES-E1BのE1A上流にあるXhoI部位に順方向に挿入した (phTERT-E1A-IRES-E1B) 。

#### 【0043】

pShuttleベクターに含まれるサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを制限酵素MfeIおよびNheI処理により取り除き、その部位にphTERT-E1A-IRES-E1Bより制限酵素NheIおよびNotIで切り出した3828 bpの配列を挿入した (pSh-hAIB) 。

#### 【0044】

pSh-hAIBより制限酵素I-CeuIおよびPI-SceIにより4381 bpの配列を切り出し、Adeno-X Expression System (CLONTECH) のAdeno-X Viral DNAに挿入した (Adeno-X-hAIB) 。AdenoX-hAIBを制限酵素PacI処理で線状化した後、293細胞にトランسفエクションし、感染性のある組換えアデノウイルスを作製した (TRAD) 。TRADの模式図を図1に示す。

#### 【0045】

#### 実施例2

##### <ヒト癌細胞及び正常細胞におけるテロメラーゼ活性の比較>

ヒト肺癌細胞 (A549、H226Br、H1299) 、ヒト大腸癌細胞 (SW620、DLD-1、LoVo) 、ヒト胎児腎臓細胞293、SV40遺伝子導入で不死化したヒト血管内皮細胞HUVE C、ヒト正常線維芽細胞 (WI38、NHLF) の10種類の細胞からRNazol (Cinna/Biot ex) を用いてRNAを抽出し、LightCyclerおよびLightCycler DNA TeloTAGGG Kit (Roche Molecular Biochemicals) を用いてリアルタイム定量的reverse transcription (RT) -PCRを行い、それぞれの細胞におけるhTERT遺伝子発現レベルを比較した。結果を図2に示す。

#### 【0046】

最も発現レベルの高かったA549細胞を1.0として比較すると、A549、H226Br、H1299、SW620、DLD-1、LoVoなどの癌細胞及び293細胞では0.18～1.00のhTERT遺伝

子発現が確認されたが、不死化したHUVEC細胞やWI38、NHLFなどの正常細胞ではその発現は検出されなかった。

#### 【0047】

##### 実施例3

＜ヒト癌細胞及び正常細胞における、TRAD感染後のE1A及びE1BのmRNA及びタンパク質の発現＞

ヒト大腸癌細胞SW620及びヒト正常線維芽細胞WI38をin vitroで培養し、0.1及び1 MOI (multiplicity of infection) の濃度でTRADを感染させ、36時間後にRNAを回収した。陽性コントロールとして293細胞を用いた。

#### 【0048】

GeneAmp RNA PCR Core Kitを用いてRTを行い、E1A及びE1B遺伝子に対するプライマーを用いてGeneAmp PCR system 9700 thermal cycler (PE Applied Biosystems) により30サイクルの増幅を行った。PCR産物を1.2%アガロースゲル上で泳動し、エチジウムプロマイドで染色して可視化した。バンドの強度をイメージアナライザーにて測定し、GAPDHを内部コントロールとして定量化してグラフ化した。

#### 【0049】

ヒト大腸癌細胞SW620及びヒト正常線維芽細胞WI38をin vitroで培養し、0.1及び1 MOIの濃度でTRADを感染させ48時間後に付着細胞を回収、溶解液中で30分反応させた後に遠沈し、上清のタンパク質濃度を測定した。12%ポリアクリルアミドゲル上で泳動し、膜にトランスファーした後、抗アデノウイルス5型E1A抗体 (PharMingen International) を用いてウエスタンプロット解析を行った。結果を図3に示す。

#### 【0050】

癌細胞であるSW620においては、TRADの感染により明らかに強いE1A遺伝子 (502 bp)、E1B遺伝子 (543 bp) の発現がみられたが、正常細胞であるWI38では弱い発現がみられたのみであった (図3A)。陽性コントロールの293細胞では、中等度の発現が認められた。

#### 【0051】

ウエスタンプロット解析では、SW620において0.1 MOI、1 MOIとTRADの濃度に従ってE1Aタンパク質の発現が増強した（図3B）。一方、WI38では1 MOIでもほとんど発現が検出さなかった。

### 【0052】

#### 実施例4

##### <ヒト癌細胞及び正常細胞におけるTRAD感染後の細胞内増殖の検討>

ヒト癌細胞SW620、H1299及びヒト正常細胞WI38、NHLFにTRADを1 MOIで2時間37℃で感染させ、TRADを含む培養液を捨て、新しい培養液で1回洗浄、さらに新しい培養液を加えた。その直後にDay 0としてスクレーパーで細胞を回収、凍結融解を繰り返した後に1 mlの培養液に浮遊させた。更に、同様の方法でDay 1、2、3、5、7にウイルスを回収し、力価測定を行った。結果を図4に示す。

### 【0053】

正常細胞であるWI38やNHLFでは、10<sup>2</sup> PFUのTRADが3日目には10<sup>5</sup> PFU程度と100～1000倍の増殖がみられたが、癌細胞であるSW620やH1299では10<sup>7</sup>～10<sup>8</sup> PFUと10<sup>5</sup>～10<sup>6</sup>倍の増殖が認められ、癌細胞特異的なウイルス増殖が確認された。

### 【0054】

#### 実施例5

##### <ヒト癌細胞および正常細胞におけるTRADの細胞障害活性>

24ウェルプレートに、5種類のヒト癌細胞（SW620、H1299、A549、DLD-1、H226 Br）を6～8×10<sup>4</sup>個／ウェル、及び2種類のヒト正常細胞（WI38、NHLF）を2～4×10<sup>4</sup>個／ウェルで蒔き、24時間後にTRADを0.01、0.1、1、2、5 MOIで感染させた。感染から96時間後に、顕微鏡下にSW620、DLD-1、NHLF細胞の形態学的变化を観察した。更に、すべての細胞において、培養液を捨て、生細胞をCoomassie brilliant blueで染色し、スキャナーにてマクロ画像を取り込んだ。

### 【0055】

96ウェルプレートにSW620、H1299を10<sup>4</sup>個／ウェル、NHLFを5×10<sup>3</sup>個／ウェルで蒔き、TRADを0（非感染細胞）、0.01、0.1、1 MOIで感染させ、XTTアッセイにてDay 1、2、3、5、7に生細胞数を計測した。4ウェルずつで測定し、非感染細胞を1.0として平均値+/- SDにてグラフ化した。結果を図5、6及び7に示す。

## 【0056】

SW620、H1299、A549、DLD-1、H226Brなどの癌細胞では、TRADの濃度依存性に細胞数が減り、青く染まる領域が減少しているのがわかる。一方、WI38、NHLFなどの正常細胞では、青く染色される生細胞数の顕著な減少は認められなかった。(図5)。

## 【0057】

顕微鏡所見では、SW620、DLD-1細胞はプレートの底面から剥がれて円形化し、細胞密度も減少していたが、NHLFではほとんど形態学的变化はみられず、細胞数の減少も認められなかった(図6)。

## 【0058】

SW620およびH1299では、1 MOIのTRADの感染により3日目までのほぼ100%の細胞死が観察され、0.1 MOIでも80%以上の細胞数減少が認められた。NHLFでは3日目にはほとんど細胞数の減少はみられず、7日目には1 MOIのTRADで60%程度の細胞数の低下が観察されたが、0.01 MOIでは全く影響されなかった(図7)。

## 【0059】

### 実施例6

#### ＜動物モデルを用いたTRADの抗腫瘍活性の検討＞

5 - 6週齢ヌードマウスの背部皮下にヒト肺癌細胞H358を $5 \times 10^6$ 個移植し、直徑が約5 - 6 mmとなった時点で、p53遺伝子を発現する非増殖性アデノウイルスベクター(Ad-p53)を $1 \times 10^8$  PFU、 $3 \times 10^8$  PFU、 $1 \times 10^9$  PFUを連日2日間腫瘍内局所注入した。その後、直交する腫瘍径を定期的に測定し、推定腫瘍重量を(長径) × (短径)  $2/2$ で算出した。コントロールとして挿入遺伝子をもたない非増殖性アデノウイルスベクターd1312を用いた。

## 【0060】

5 - 6週齢ヌードマウスの背部皮下にヒト大腸癌細胞SW620を $5 \times 10^6$ 個移植し、直徑が約5 - 6 mmとなった時点で、 $2 \times 10^7$  PFUのd1312及び $4 \times 10^3$  PFUのTRADを連日3日間腫瘍内局所注入した。同様に腫瘍径を測定し、推定腫瘍重量を算出した。結果を図8及び9に示す。

## 【0061】

$3 \times 10^8$  PFU、 $1 \times 10^9$  PFUのAd-p53投与によりH358腫瘍の増殖は有意に ( $p < 0.05$ ) 抑制された。しかし、 $1 \times 10^8$  PFUのAd-p53投与では有意な増殖抑制は認められなかった（図8）。また、コントロールのdl312の投与では腫瘍増殖は全く影響されなかった。

#### 【0062】

抗腫瘍効果がみられたAd-p53よりも極めて低濃度である $4 \times 10^3$  PFUのTRADの腫瘍内投与により、有意差をもって ( $p < 0.05$ ) SW620腫瘍の増殖が抑制された。コントロールのdl312の投与では腫瘍増殖は全く影響されなかった。

#### 【0063】

##### 【発明の効果】

本発明のウイルスは効率良く癌細胞において増殖し、癌細胞を死滅させることができ。また、本発明のウイルスは増殖能を有しているので、投与するウイルスを低濃度にすることにより、副作用を抑制することもできる。

#### 【0064】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> KANSAI TLO

<120> Selective Replication of Tumor-specific Replication-competent Adenovirus on Tumor Cells

<130> 42002JP

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 899

<212> DNA

<213> 293 cell

&lt;400&gt; 1

acaccgggac	tgaaaatgag	acatattatc	tgccacggag	gtgttattac	cgaagaaatg	60
gccgccagtc	ttttggacca	gctgatcgaa	gaggtactgg	ctgataatct	tccacccct	120
agccatttg	aaccacctac	ccttcacgaa	ctgtatgatt	tagacgtgac	ggccccgaa	180
gatcccaacg	aggaggcggt	ttcgcagatt	tttcccgact	ctgtaatgtt	ggcggtgcag	240
gaagggattg	acttactcac	tttccgccc	gcccgggtt	ctccggagcc	gcctcacctt	300
tcccggcagc	ccgagcagcc	ggagcagaga	gccttgggtc	cggttctat	gccaacac	360
gtaccggagg	tgatcgatct	tacctgcccac	gaggctggct	ttccacccag	tgacgacgag	420
gatgaagagg	gtgaggagtt	tgtgttagat	tatgtggagc	accccggca	cgggtgcagg	480
tcttgcatt	atcaccggag	gaatacgggg	gaccagata	ttatgtgttc	gctttgctat	540
atgaggacct	gtggcatgtt	tgtctacagt	cctgtgtctg	aacctgagcc	tgagcccgag	600
ccagaaccgg	agcctgcaag	acctacccgc	cgtcctaaaa	tggcgctgc	tatcctgaga	660
cgcggacat	cacctgtgtc	tagagaatgc	aatagtagta	cggatagctg	tgactccggt	720
ccttctaaca	cacccctga	gatacaccgg	gtggtcccgc	tgtccccat	taaaccagtt	780
gccgtgagag	ttgggtggcgc	tcgcccaggct	gtggaatgta	tcgaggactt	gcttaacgag	840
cctggcaac	ctttggactt	gagctgtaaa	cgcggcaggc	cataagggtgt	aaacctgtg	899

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1823

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 293 cell

&lt;400&gt; 2

ctgacacctat	ggaggcttgg	gagtgtttgg	aagattttc	tgctgtgcgt	aacttgctgg	60
aacagagctc	taacagtacc	tcttggttt	ggaggttct	gtggggctca	tcccaggcaa	120
agtttagtctg	cagaatthaag	gaggattaca	agtggaaatt	tgaagagctt	ttgaaatcct	180
gtggtgagct	gtttgattct	ttgaatctgg	gtcaccaggc	gctttccaa	gagaaggta	240
tcaagacttt	ggattttcc	acaccggggc	gcgctgcggc	tgctgttgct	tttttgagtt	300
ttataaaagga	taaatggagc	gaagaaaccc	atctgagcgg	gggttacctg	ctggattttc	360
tggccatgca	tctgtggaga	gcgggtgtga	gacacaagaa	tgcctgcta	ctgttgcttt	420

ccgtccgccc ggcgataata ccgacggagg agcagcagca gcagcaggag gaagccaggc	480
ggcggcggca ggagcagagc ccatggaacc cgagagccgg cctggaccct cggaatgaa	540
tgttgtacag gtggctgaac tgtatccaga actgagacgc attttgacaa ttacagagga	600
tggcaggggg ctaaaggggg taaagaggga gcggggggct tgtgaggcta cagaggaggc	660
taggaatcta gcttttagct taatgaccag acaccgtcct gagtgttata ctttcaaca	720
gatcaaggat aattgcgcta atgagcttga tctgctggcg cagaagtatt ccatagagca	780
gctgaccact tactggctgc agccagggga tgatttgag gaggcttata gggtatatgc	840
aaaggtggca cttaggccag attgcaagta caagatcagc aaacttgtaa atatcaggaa	900
tttgtctac atttctggga acggggccga ggtggagata gatacggagg atagggtggc	960
cttagatgt agcatgataa atatgtggcc gggggtgctt ggcattggac gggtggttat	1020
tatgaatgta aggttactg gcccccaattt tagcggtacg gtttcctgg ccaataccaa	1080
ccttattccta cacgggttaa gcttctatgg gtttaacaat acctgtgtgg aagcctggac	1140
cgtgttaagg gttcgggct gtgccttta ctgctgctgg aagggggtgg tgtgtcgccc	1200
caaaagcagg gcttcaatta agaaatgcct cttgaaagg tgtaccttgg gtatcctgtc	1260
tgagggttaac tccagggtgc gccacaatgt ggcctccgac tgtggtgct tcatgctagt	1320
gaaaagcgtg gctgtgatta agcataacat ggtatgtggc aactgcgagg acaggccctc	1380
tcagatgctg acctgctcgg acggcaactg tcacctgctg aagaccattc acgtagccag	1440
ccactctcgc aaggcctggc cagtgttta gcataacata ctgaccgct gttccttgca	1500
tttgggttaac aggagggggg tttcctacc ttaccaatgc aatttgagtc acactaagat	1560
attgctttag cccgagagca tgtccaaggta gacccgtac ggggtgtttg acatgaccat	1620
gaagatctgg aaggtgctga ggtacgtac gacccgcacc aggtgcagac cctgcgagtg	1680
tggcgttaaa catattagga accagcctgt gatgctggat gtgaccgagg agctgaggcc	1740
cgatcacttg gtgctggcct gcacccgcgc tgagttggc tctagcgtatg aagatacaga	1800
 ttgaggtact gaaatgtgtg ggc	1823

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 605

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 293 cell

&lt;400&gt; 3

tgcatctagg	gcggccaatt	cgccccct	ccctccccc	ccccta	acgt	tactggccga	60
agccgcttgg	aataaggccg	gtgtgcgtt	gtctatatgt	gat	tttccac	catattgccg	120
tctttggca	atgtgagggc	ccggaaacct	ggccctgtct	tctt	gacgag	cattcctagg	180
ggtctttccc	ctctcgccaa	aggaatgcaa	ggtctgttga	atgtcgtgaa	ggaagcagtt	240	
cctctggaag	cttcttgaag	acaaacaacg	tctgtacgta	ccctttgcag	gcagcggAAC	300	
cccccacctg	gcgacaggtg	cctctgcggc	caaaagccac	gtgtataaga	tacacc	tgc	360
aaggcggcac	aaccccagt	ccacgttgt	agttggatag	ttgtggaaag	agtcaaaatgg	420	
ctctcctcaa	gcgtattcaa	caagggctg	aaggatgccc	agaagg	tacc	tatgg	480
gatctgatc	tggggcctcg	gtgcacatgc	tttacatgt	tttagtgcag	gttaaaaaaa	540	
cgtctaggcc	ccccgaacca	cggggacgtg	gtttcctt	aaaaaacacg	atgataagct	600	
tgcca							605

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 455

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 293 cell

&lt;400&gt; 4

tggccc	ctcggttac	cccacagc	cc	aggccgattc	gac	ctctc	cgctggg	60
tcgctggcg	tccctgcacc	ctgggagc	gc	gagcggc	cg	ggcggg	ga	120
agaccc	ccgg	gtccgccc	gg	agcagct	ctg	tcggg	c	180
ttcgcc	ca	gacgccc	gg	gaccgc	ctt	ccacgt	gg	240
gcaccc	gtcc	ggca	gg	gcgt	c	ccgcgg	act	300
ccgaccc	ctc	cc	gggt	ccccc	c	ccgcgg	ggcc	360
tttccgc	cc	cc	cc	cctcc	c	ccgcgt	cc	420
gcacgt	gg	gg	gg	ccgc	cc	ccgcgt	cc	455

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 5

acaccgggac tgaaaatgag

20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 6

cacaggttta caccttatgg c

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 7

ctgacctcat ggaggcttgg

20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 8

gcccacacat ttcagtacct c

21

【図面の簡単な説明】

【図1】 腫瘍細胞において選択的に増殖する腫瘍融解ウイルスの構造の模式図を示す。非増殖性ウイルスベクターでは欠失しているE1遺伝子領域に、hTER TプロモーターとE1A遺伝子、IRES配列、E1B遺伝子よりになる増殖カセット（Replication cassette）が挿入されている。

【図2】 ヒト癌細胞および正常細胞におけるテロメラーゼ活性の比較を示す。

【図3】 ヒト癌細胞および正常細胞におけるTRAD感染後のE1A及びE1BのmRNA及びタンパク質の発現を示す。

【図4】 ヒト癌細胞および正常細胞におけるTRAD感染後の細胞内増殖の検討を示す。

【図5】 ヒト癌細胞および正常細胞におけるTRADの細胞障害活性（Coomassie brilliant blue染色による検討）を示す。

【図6】 ヒト癌細胞及び正常細胞におけるTRADの細胞障害活性（顕微鏡所見）を示す。

【図7】 ヒト癌細胞及び正常細胞におけるTRADの細胞障害活性（XTTアッセイによる検討）を示す。

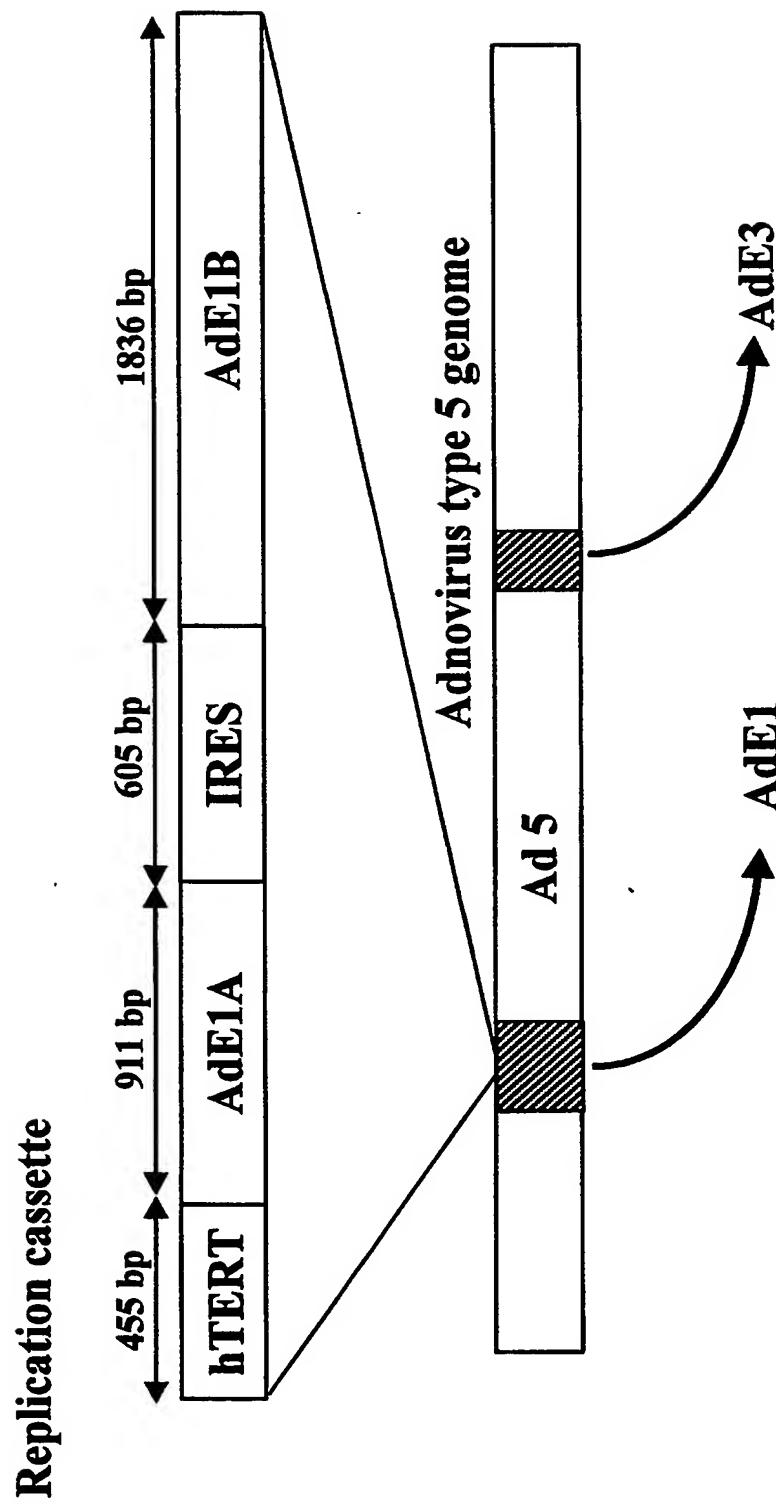
【図8】 ヌードマウスとヒト肺癌細胞H358を用いた非増殖性p53遺伝子発現アデノウイルスベクターの腫瘍内局所投与の抗腫瘍効果を示す。

【図9】 ヌードマウス及びヒト大腸癌細胞SW620を用いたTRADの腫瘍内局所投与の抗腫瘍効果の示す。

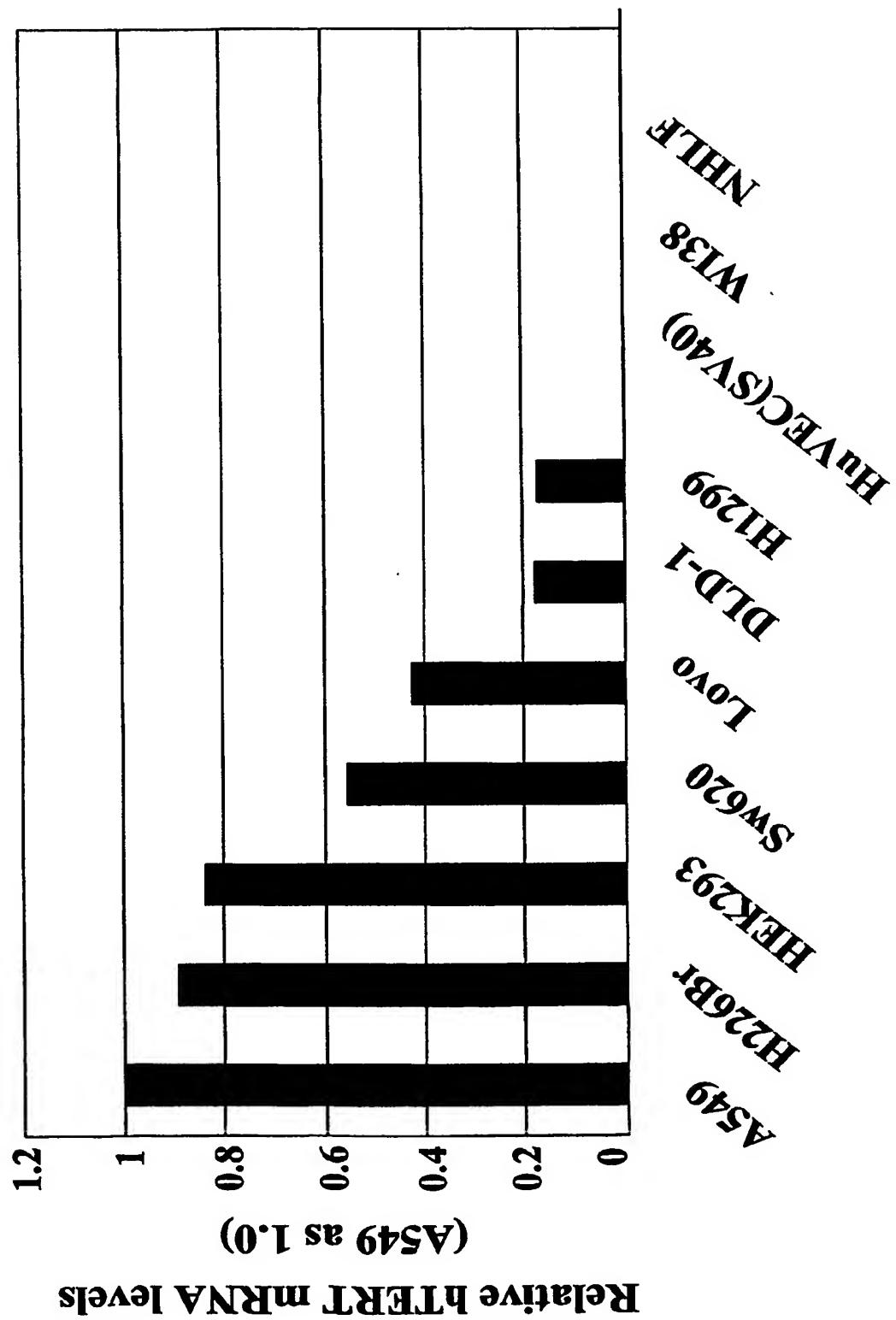
【書類名】

図面

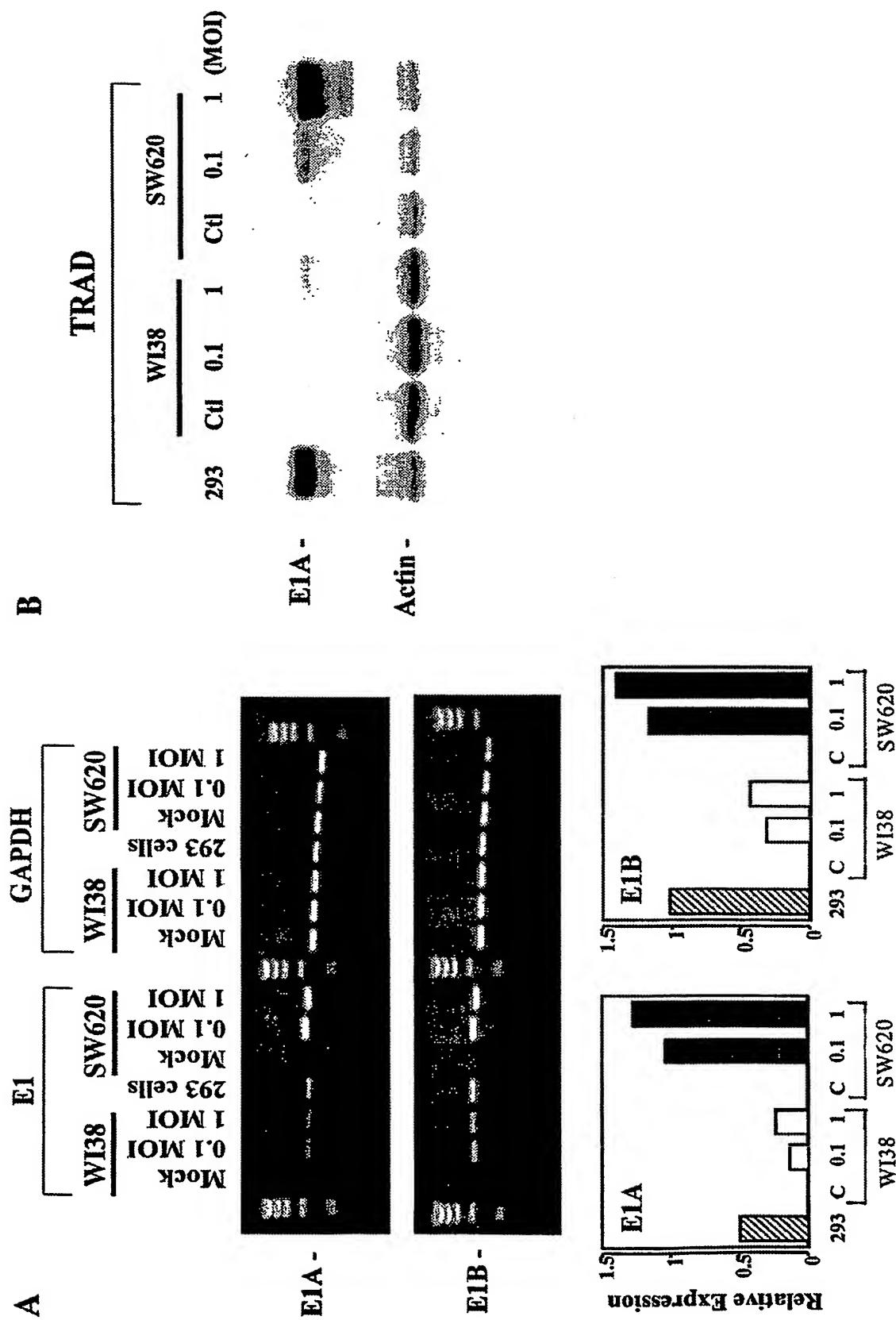
【図 1】



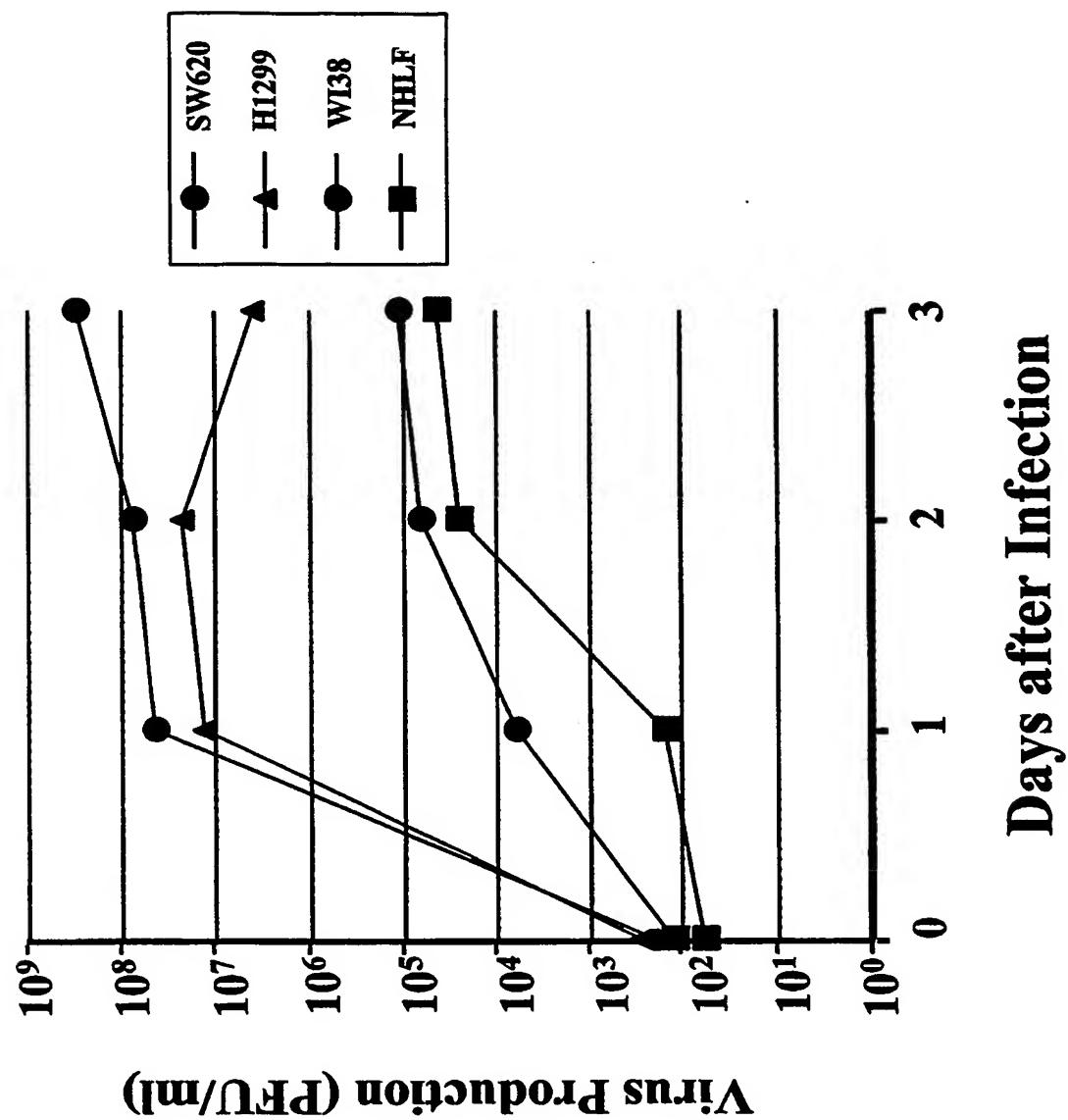
【図2】



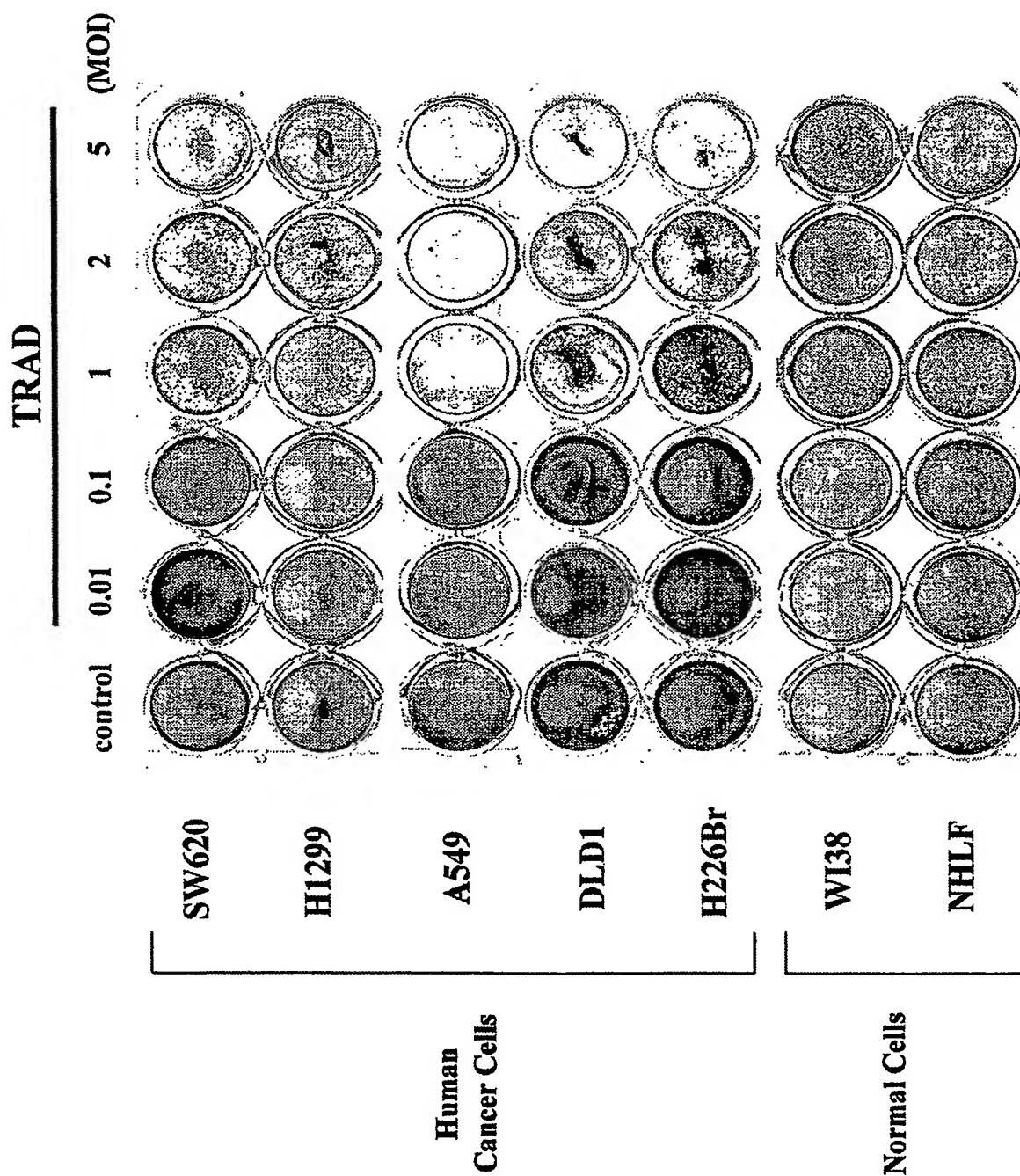
【図3】



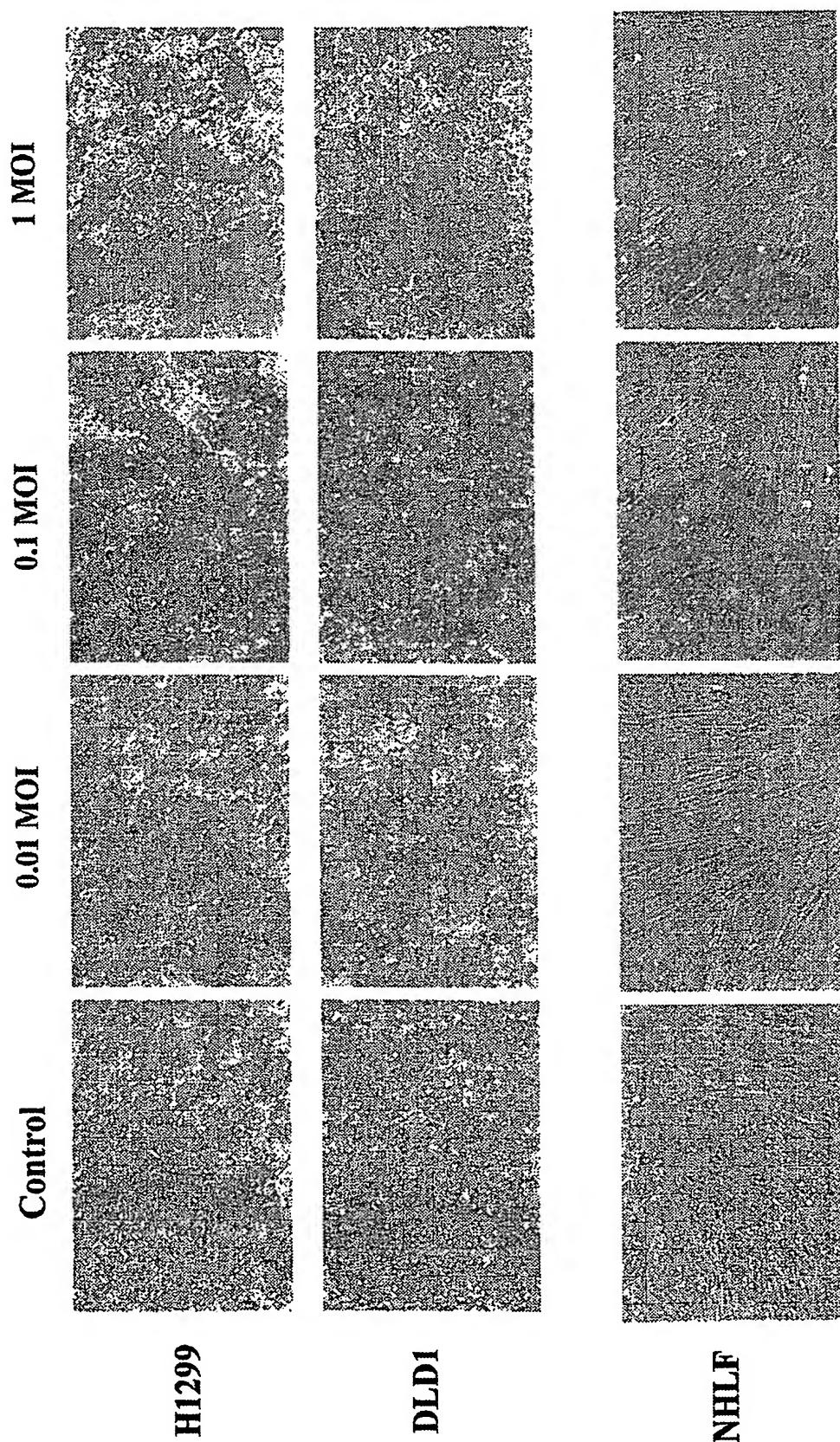
【図4】



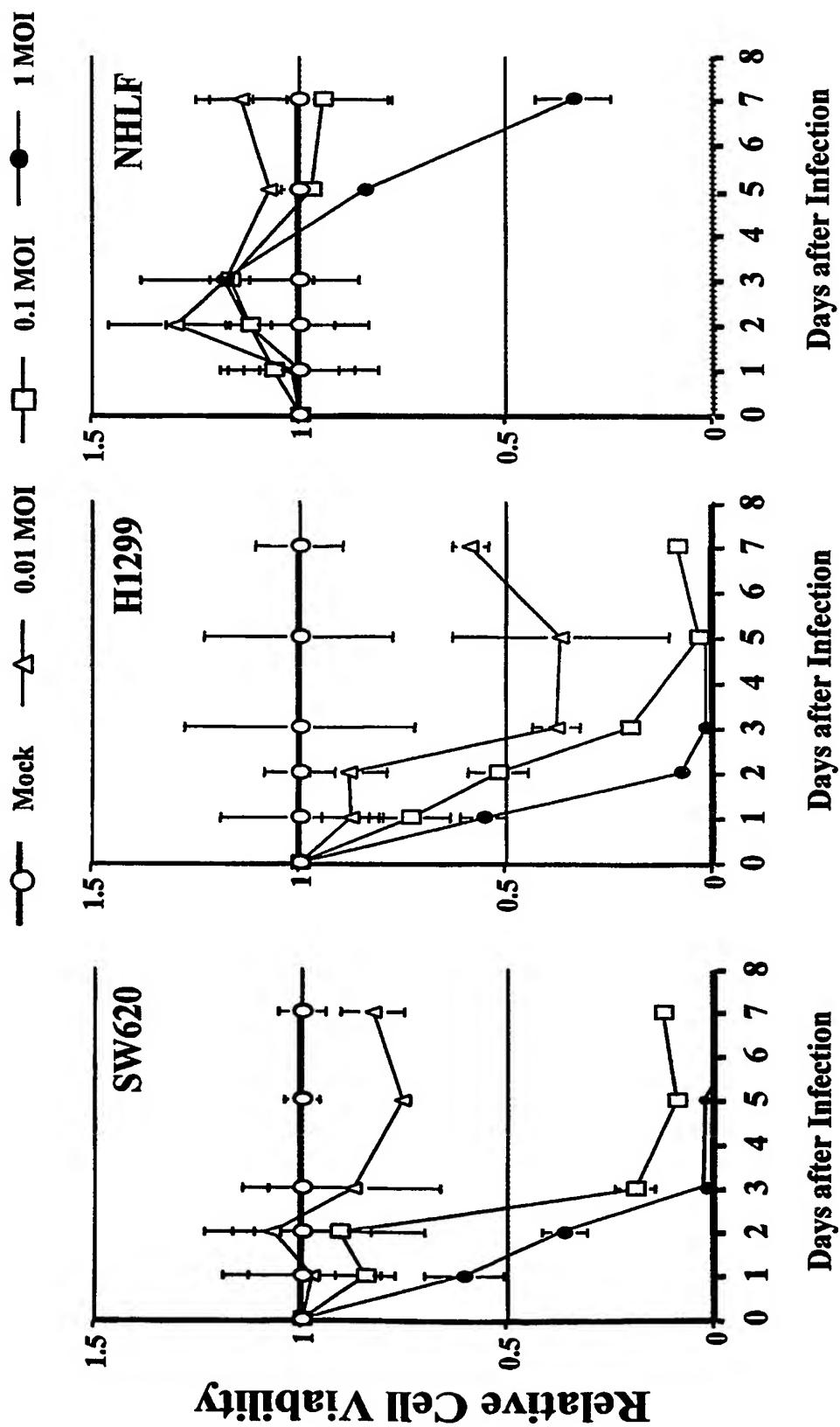
【図5】



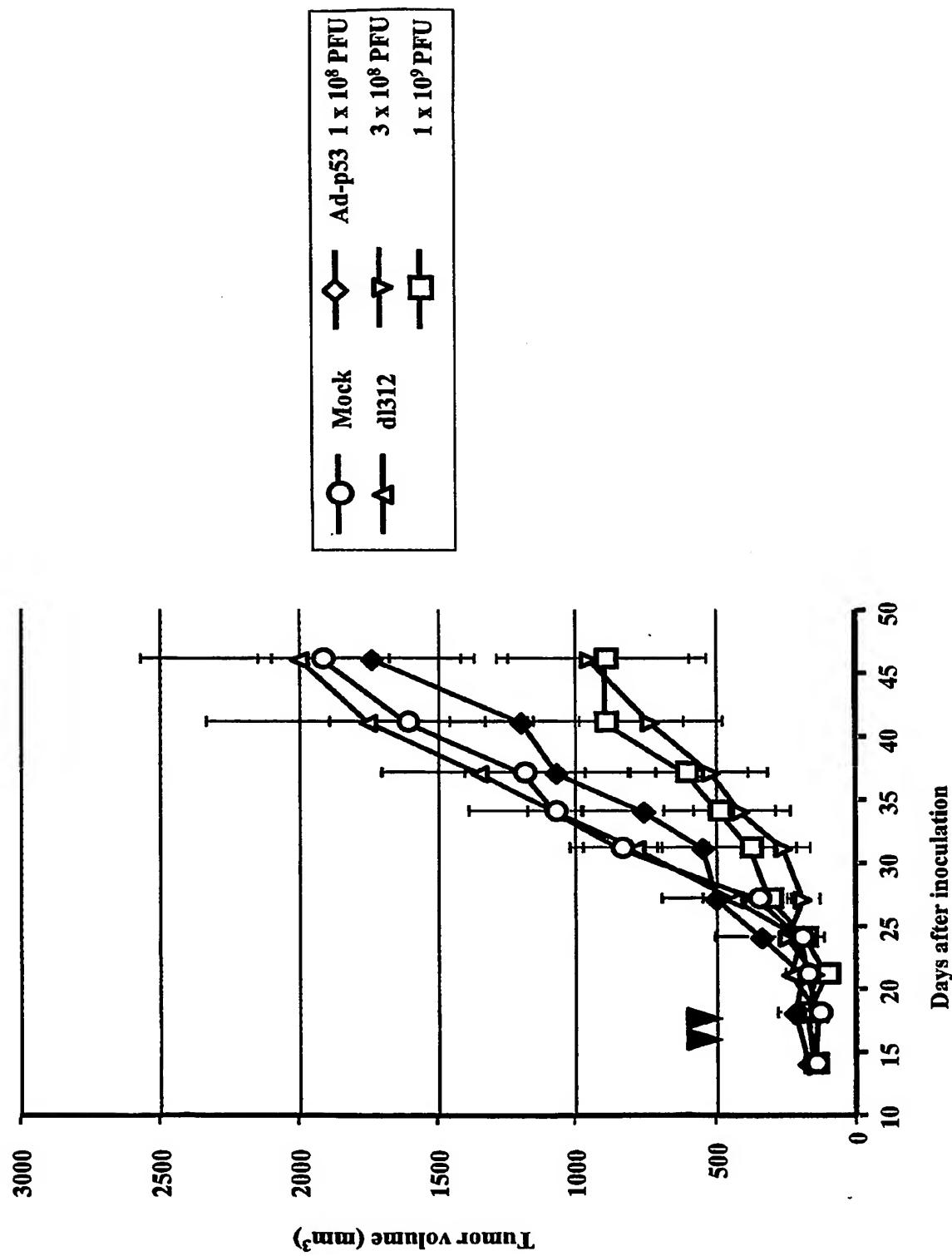
【図 6】



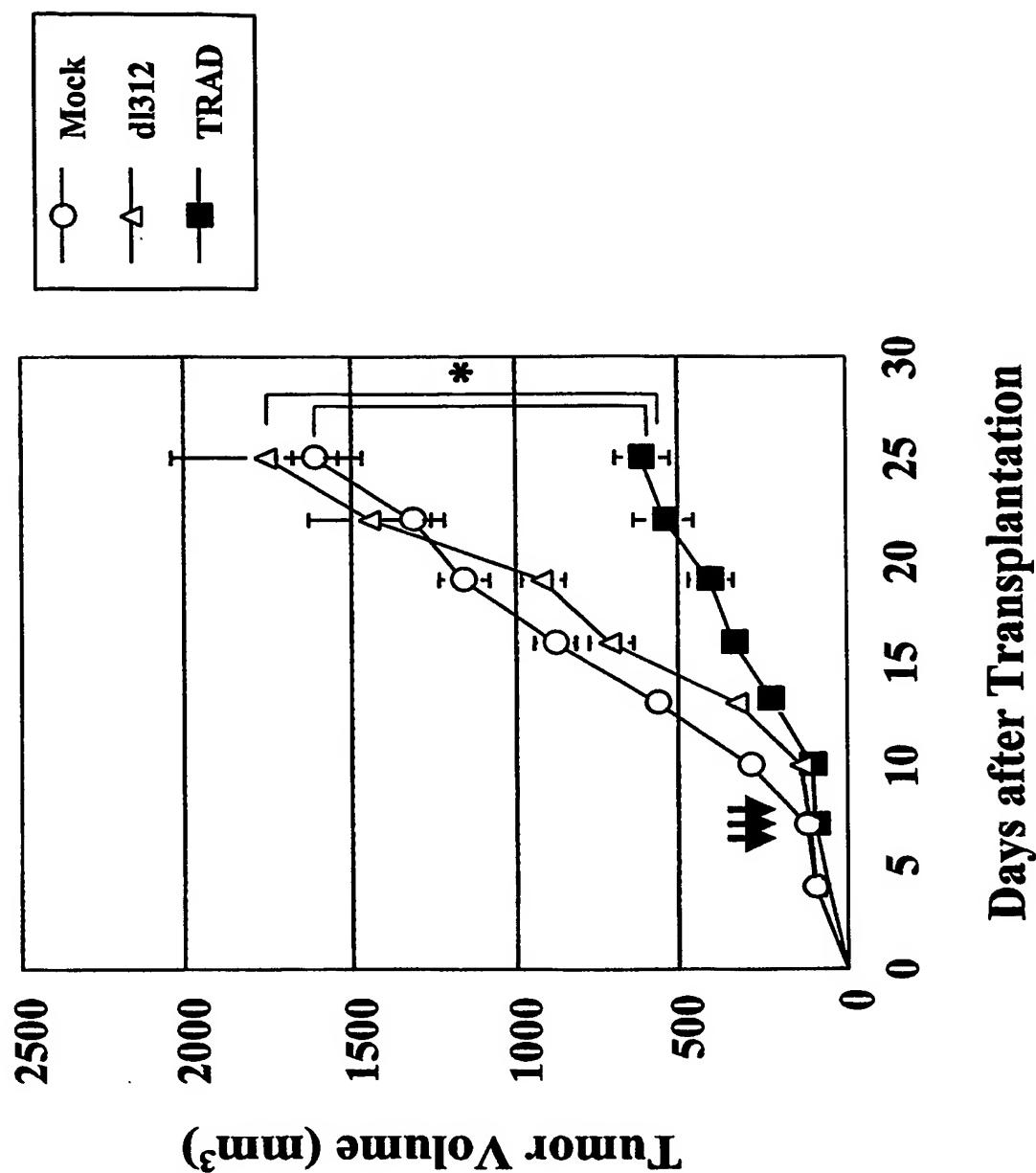
【図7】



【図 8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 腫瘍細胞において増殖し、抗癌作用を示すウイルスを提供すること。

【解決手段】 テロメラーゼのプロモーター及びE1遺伝子を含むことを特徴とする遺伝子を含むウイルス、及び該ウイルスを用いた抗癌剤。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届

【提出日】 平成14年10月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-198941

【承継人】

【識別番号】 899000046

【氏名又は名称】 関西ティー・エル・オ一株式会社

【承継人代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-6203-0941

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 4,200円

【提出物件の目録】

【包括委任状番号】 9912218

【プルーフの要否】 要

特願 2002-198941

出願人履歴情報

識別番号

[899000046]

1. 変更年月日 1999年 9月 17日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市下京区中堂寺栗田町1番地  
氏 名 関西ティー・エル・オー株式会社

2. 変更年月日 2002年 8月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 京都府京都市下京区中堂寺栗田町93番地  
氏 名 関西ティー・エル・オー株式会社

待願 2002-198941

出願人履歴情報

識別番号 [502246584]

1. 変更年月日 2002年 7月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科内

氏 名 藤原 俊義

特願 2002-198941

出願人履歴情報

識別番号 [502246252]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

2002年 7月 8日

新規登録

岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学大学院医歯学総

合研究科 消化器・腫瘍外科内

白木屋 佳子

出願 2002-198941

出願人履歴情報

識別番号

[502246263]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

2002年 7月 8日

新規登録

岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科内

川嶋 健

特願2002-198941

出願人履歴情報

識別番号 [502246702]

1. 変更年月日 2002年 7月 8日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学大学院医歯学総  
合研究科 消化器・腫瘍外科内  
氏 名 田中 紀章

出願 2002-198941

出願人履歴情報

識別番号 [502246285]

1. 変更年月日 2002年 7月 8日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 石川県金沢市宝町13-1 金沢大学医学部産婦人科内  
氏 名 京 哲

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**